二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗性及抗性相关基因表达分析

刘贻聪，王 玲，张友军，谢 文，吴青君，王少丽*

（中国农业科学院蔬菜花卉研究所，北京 100081）

摘要：【目的】二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 是为害多种农作物的世界性重大害螨。本研究旨在明确二斑叶螨不同田间种群对阿维菌素的抗药性、抗性相关基因的突变频率及其表达量变化。【方法】采用药管浸叶法测定了我国二斑叶螨 8 个地理种群对阿维菌素的抗药性并检测其抗性基因突变频率，结合荧光定量 PCR 技术分析了高抗种群中抗性相关基因表达量变化。【结果】测试的二斑叶螨 8 个田间种群均对阿维菌素具有抗药性。北京密云、山东潍坊、海南三亚和湖南长沙种群均对阿维菌素产生了极高水平的抗性，抗性倍数分别为 1 526.75，481.00，315.25 和 160.75 倍，而北京通县、北京海淀、山西运城和山东泰安种群对阿维菌素的抗性倍数达 54.38 ~ 136.38 倍，处于高抗性水平。二斑叶螨对阿维菌素抗性相关的谷氨酸氯离子通道基因 *GluCl* 的突变频率在各个田间种群中存在差异。北京密云种群中 *GluCl* 的突变频率最高（91.7%），其次是山东潍坊（66.7%）和海南三亚（63.3%）种群；山西运城种群最低（13.3%），且点突变频率与抗性倍数之间呈显著的正相关（$P < 0.05$）。与相对敏感种群相比，高抗性二斑叶螨种群中 *GluCl* 和 γ-氨基丁酸受体基因 *GABAR* 表达量显著下降。【结论】二斑叶螨田间种群普遍对阿维菌素产生了高水平抗性，抗性相关基因 *GluCl* 的点突变及其表达量的降低可能与田间抗药性产生相关；田间防治二斑叶螨应避免使用阿维菌素。

关键词：二斑叶螨；阿维菌素；抗药性；抗性相关基因；基因表达量

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2016)11-1199-07

Abamectin resistance and expression of resistance-related genes in field populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in China

LIU Yi-Cong, WANG Ling, ZHANG You-Jun, XIE Wen, WU Qing-Jun, WANG Shao-Li* (Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Aim】The two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch is an important pest on many agricultural crops worldwide. This study aims to understand the current abamectin resistance and the mutation frequency and expression change of resistance-related genes in different field populations of *T. urticae* in China. 【Methods】The resistance of eight field populations of *T. urticae* to abamectin was determined by vial-leaf dipping (VLD) method, and the gene mutation frequency related to abamectin resistance was detected and the expression levels of genes likely related to abamectin resistance in highly resistant populations were determined by quantitative RT-PCR technique. 【Results】All the eight field populations of *T. urticae* tested developed resistance to abamectin. Extremely high resistance to abamectin was found in the populations from Miyun, Beijing (MY-BJ), Weifang, Shandong (WF-SD), Sanya, Hainan (SY-HN), and Changsha, Hunan (CS-HN), with the resistance ratios of 1 526.75-,

---

基金项目：公益性行业（农业）科研专项（201203038）；国家现代西甜瓜产业技术体系（CARS-26-10）项目；农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

作者简介：刘贻聪，女，1993 年 8 月生，河南开封人，硕士研究生，研究方向为蔬菜害虫综合治理，E-mail：yicongliu0829@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：wangshaoli@caas.cn

收稿日期 Received：2016-08-04；接受日期 Accepted：2016-09-15

481.00-, 315.25-, and 160.75-fold, respectively. In the populations from Tongxian, Beijing (TX-BJ), Haidian, Beijing (HD-BJ), Yuncheng, Shanxi (YC-SX), and Tai'an, Shandong (TA-SD), high resistance was observed with the resistance ratios ranging from 54.38- to 136.38-fold. The mutation frequency of the glutamate-gated chloride ion channel gene *GluCl* related to abamectin resistance differed in the eight field populations. The highest and lowest mutation frequencies were found in MY-BJ (91.7%) and YC-SX (13.3%) populations, respectively, while moderate mutation frequencies were found in WF-SD and SY-HN populations. There was a significantly positive correlation between resistance level and the mutation frequency of *GluCl* ($P<0.05$). The expression levels of *GluCl* and γ-aminobutyric acid receptor gene (*GABAR*) in the resistant populations decreased significantly as compared with those in the relatively susceptible strain. 【Conclusion】Abamectin resistance exists widely in field populations of *T. urticae* in China. Resistance-related genes with point mutation and the decreased expression are likely relevant to resistance development. Abamectin should be avoided to be applied in controlling *T. urticae* in fields.

Key words: *Tetranychus urticae*; abamectin; insecticide resistance; resistance-related gene; gene expression

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 又名二点叶螨,是世界性的重大农业害螨。化学药剂是防控二斑叶螨的主要手段,但是由于其寄主植物范围广、食性杂、繁殖快等特点,导致其对化学药剂的抗药性发展快速,目前二斑叶螨已对 90 多种有机磷、拟除虫菊酯类、抗生素类等杀虫、杀螨剂产生了不同程度的抗药性(Van Leeuwen *et al*., 2010; Tang *et al*., 2014),这也成为二斑叶螨田间种群化学防控的重要阻碍因子。为了达到对田间种群的高效防控,对二斑叶螨田间种群进行抗药性监测和检测是实现科学选药的重要前提和基础。

阿维菌素是一种大环内酯抗生素类杀虫剂,因其杀虫杀螨活性强,高效低残留等特点而备受关注(Clark *et al*., 1995; Nauen *et al*., 2001)。阿维菌素对二斑叶螨的毒力较高,但是在北京大兴、昌平等蔬菜基地,发现茄子二斑叶螨的防治效果明显下降或者抗药性明显上升的现象(李明远, 2012; 唐小凤等, 2014);山东昌乐和寿光蔬菜大棚内二斑叶螨卵对阿维菌素已产生了很高的抗性(刘庆娟等, 2012)。Kwon 等(2010)研究表明,谷氨酸门控氯离子通道(glutamate mediated chloride channel, GluCl)基因 G323D 的点突变在阿维菌素的抗药性形成中至关重要。基于该点突变,唐小凤等(2014)建立了二斑叶螨对阿维菌素的抗药性的等位基因特异性 PCR(PASA)检测技术,可根据目的扩增条带的有无快速检测明确田间种群(个体)对阿维菌素的抗药性。

文献报道表明,二斑叶螨对阿维菌素的抗性机制除了抗性基因出现了点突变外,还涉及到解毒酶活性的提高以及抗性相关基因的表达量变化(Van Leeuwen *et al*., 2010)。阿维菌素靶标受体基因除了 *GluCl* 外,还可能与 γ-氨基丁酸受体(γ-aminobutyric acid receptor, GABAR)亚基相关(Gorman *et al*., 2001; Rugg *et al*., 2005)。Kwon 等(2010)报道,二斑叶螨对阿维菌素的抗性不仅与 *GluCl* 基因的点突变有关,也与该基因的 mRNA 表达量有关,但与 *GABAR* 基因的 mRNA 表达量无关。但陈秋双(2013)的研究发现在朱砂叶螨 *T. cinnabarinus* 抗性种群中,*GABAR* 基因的 mRNA 表达量显著低于敏感种群,表明叶螨不同种类中对同一种杀虫剂的抗性机制可能存在差异。

为明确我国不同地区二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗药性及其抗性相关的点突变频率和抗性可能相关基因在二斑叶螨抗性种群中的表达量,本研究首先对采集自我国的 8 个二斑叶螨种群进行阿维菌素的抗药性监测,采用特异性等位基因 PCR 技术检测其 *GluCl* 基因的突变频率,并分析二斑叶螨敏感和抗性种群中 *GluCl* 和 *GABA* 表达量差异,以期为二斑叶螨的有效防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试叶螨

二斑叶螨室内相对敏感种群(susceptible strain, SS)由南京农业大学洪晓月教授 2009 年惠赠,在人工气候箱内采用“碧丰”菜豆叶片制作的“海绵叶盘”法进行继代饲养,期间未接触任何杀虫剂。所测试 8 个田间抗性种群的采集地点、寄主植物和采

集时间等信息见表 1。田间种群采集后，在显微镜下鉴定为二斑叶螨，再挑取到新鲜菜豆叶片进行饲养，培养一代后进行生物测定。二斑叶螨种群饲养条件为 26 ±1℃，光周期为 16L∶8D。

表 1 二斑叶螨 8 个田间种群的采集信息

Table 1 Sampling information of eight field populations of *Tetranychus urticae* in China

种群代码 Population code	采集地点 Collecting locality	地理坐标 Geographical coordinates	采集日期 Collecting date	寄主植物 Host plant
TX-BJ	北京通县 Tongxian, Beijing	39°54′N, 116°39′E	2014-03	草莓 Strawberry
MY-BJ	北京密云 Miyun, Beijing	40°22′N, 116°52′E	2014-10	茄子 Eggplant
HD-BJ	北京海淀 Haidian, Beijing	39°57′N, 116°18′E	2014-04	小白菜 Pakchoi cabbage
WF-SD	山东潍坊 Weifang, Shandong	36°51′N, 118°49′E	2014-08	苹果树 Apple tree
TA-SD	山东泰安 Tai'an, Shandong	36°12′N, 117°05E	2014-09	茄子 Eggplant
YC-SX	山西运城 Yuncheng, Shanxi	35°08′N, 111°49′E	2014-08	茄子 Eggplant
CS-HN	湖南长沙 Changsha, Hunan	28°12′N, 113°05′E	2014-11	甜瓜 Melon
SY-HN	海南三亚 Sanya, Hainan	18°15′N, 109°31′E	2014-04	西瓜 Watermelon

1.2 主要试剂和仪器

杀螨剂为 1.8% 阿维菌素乳油，由河北威远生化化工股份有限公司生产。基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司；DNA 聚合酶为 2 × Es Taq MasterMix（0.1 U TaqE/μL），由北京康为试剂生物科技有限公司生产。cDNA 第一链合成试剂盒 PrimeScript® RT with gDNA Eraser 为 TaKaRa 公司产品；荧光定量预混试剂 SuperReal PreMix Plus（SYBR Green）为天根生化科技（北京）有限公司产品。扩增引物委托上海英竣生物工程公司合成，扩增基因序列委托擎科（北京）生物工程有限公司测定。

智能人工气候箱 RXZ-380C 为宁波江南仪器厂产品；伯乐 S1000 型 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品；荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司的 7500 型。

1.3 二斑叶螨抗药性测定

二斑叶螨抗药性测定方法采用 Wang 等（2015）的方法。将药剂用蒸馏水稀释成 5 ~7 个浓度，用稀释液装满 2 mL 的塑料离心管，盖上盖子放置于室温条件下，期间每 15 min 上下颠倒离心管 20 次。2 h 后，将稀释液倒掉，离心管倒放在通风橱下晾干 2 h。同时，选择干净的“碧丰”菜豆叶片，用打孔器打出直径为 1 cm 的叶碟，将叶碟浸入不同浓度的药剂稀释液中，10 s 后取出，用滤纸轻轻吸掉多余药液，置于通风橱下晾 1 ~2 h，将带药叶片放入带药离心管后，用毛笔挑取 30 头左右的待测的二斑叶螨雌成螨放入离心管中，盖上盖。每个处理重复 4 次，于 24 h 后检查叶螨的死亡情况并计算死亡率和存活率。用软毛笔轻触叶螨，如果叶螨足不动，则判定为死亡。空白对照组死亡率不超过 10%。

1.4 二斑叶螨抗性基因突变检测

采用基因组 DNA 提取试剂盒（BioTeke）提取二斑叶螨单头雌成螨的基因组 DNA，以此为模板，参照唐小凤等（2014）报道的叶螨对阿维菌素抗性的 *GluCl* 基因点突变 G323D 检测引物对，其中，抗性种群的 PCR 扩增所用引物对为 RF 和 3′405F，室内敏感种群检测所用引物对为 SF 和 3′405F，具体序列见表 2。DNA 模板、引物对及 DNA 聚合酶组成的反应体系（唐小凤等，2014）。采用如下 PCR 扩增程序：94℃ 预变性 3 min，再进行 30 个循环（94℃ 变性 20 s，62℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s），最后 72℃ 延伸 3 min。对于每个二斑叶螨田间种群，随机选取 30 头个体的基因组 DNA 扩增检测其 *GluCl* 基因型，计算获得各种群的突变基因频率，计算公式：点突变基因频率（%）=（抗性纯合子个体数/检测总数 + 抗性杂合子个体数/检测总数/2）× 100（唐小凤等，2014）。

1.5 抗性相关基因的实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）检测抗性相关基因表达量

采用 Trizol 试剂盒（Invitrogen 产品）提取二斑叶螨雌成螨的总 RNA，参照 TaKaRa 试剂盒说明书进行反转录，合成 cDNA 第一链，根据 Kwon 等（2010）报道的 *GluCl* 序列、以及 *GABAR*1 和 *GABAR*2 基因的全长序列（GenBank 登录号分别为 ABC47324.1 和 ABY66903.1），采用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物，根据实时荧光定量 PCR 对扩增产物长度的要求，分别设计各基因的 qPCR 引物（表 2）；以 *β-actin* 作为内参基因，上游引物 β-actin-F 和下游引物 β-actin-R 的序列参照杨顺义等（2013）文献报道，详见表 2。

实时荧光定量 RT-PCR 反应体系为 25 μL，其中 2×SuperReal PreMix Plus 12.5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.75 μL，cDNA 模板（约 0.1 μg/μL）1 μL，50 × ROX Reference Dye 0.5 μL，RNase-free ddH_2O 9.5 μL。扩增程序为：95℃预变性 15 min，之后进行 40 个循环，95℃变性 10 s，60℃退火 20 s，72℃延伸 35 s。设置 3 次生物学重复和 4 次技术重复。

表 2　二斑叶螨抗性基因突变与表达量检测的引物信息

Table 2　Primers for mutation and expression detection of resistance genes in *Tetranychus urticae*

引物名称 Primer name	引物序列（5′－3′） Primer sequences	引物用途 Primer usage
RF	AAGCTGTTGACATTTGGACTGA	
SF	AAGCTGTTGACATTTGGACTGG	PCR
3′405F	TGAATCCTTGGCGGTGTCAAA	
GluCl-F	TCAAATAACCAAATCGCTTCAC	
GluCl-R	ACCAACATACAACAGGGCACA	
GABAR1-F	TCGTGTCCATCTTGGTGTTAT	
GABAR1-R	CGCTTACCAATGTAACCAACA	
GABAR2-F	ATACATCCCTGCAAGCCTTAT	RT-qPCR
GABAR2-R	AACAGGTTCCCA AGAAAACGT	
β-actin-F	GAATTGAGAGTTGCCCCTGA	
β-actin-R	GTACGACCGGAAGCGTAAAG	

1.6　数据分析

二斑叶螨的生物测定数据采用 POLO Plus V1.0 进行处理，获得斜率、致死中浓度 LC_{50} 值及其 95% 的置信区间等。抗性倍数（resistance ratio，RR）= 田间种群的 LC_{50}/对应药剂在相对敏感种群中 LC_{50}。抗性水平评价按照刘凤沂等（2010）的分级标准，抗性倍数低于 3 为敏感水平，3.1～5.0 为敏感度下降，5.1～10.0 为低水平抗性，10.1～40.0 为中等水平抗性，40.1～160.0 为高水平抗性，大于 160.0为极高水平抗性。实时荧光定量 RT-PCR 表达采用 ABI7500 SDS V1.4 软件（Applied Biosystems，CA，USA）进行数据记录和分析；基因的 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析（Livak and Schmittgen，2001），结合 SPSS 19.0 软件进行数据统计，采用单因素方差分析（One-way ANOVA）中 Duncan 氏多重比较进行差异显著性检验。

2　结果与分析

2.1　二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗药性

二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗药性水平见表 3，结果表明，供试种群均对阿维菌素产生了抗药性。其中，北京密云（RR＝1 526.75）、山东潍坊（RR＝481.00）、海南三亚（RR＝315.25）和湖南长沙（RR＝160.75）种群均对阿维菌素产生了极高水平的抗性；北京通县（RR＝136.38）、北京海淀（RR＝69.13）、山西运城（RR＝63.25）和山东泰安（RR＝54.38）对阿维菌素也产生了高水平抗性（表 3）。

表 3　二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗药性

Table 3　Resistance levels of field populations of *Tetranychus urticae* to abamectin

种群代码 Population code	斜率±标准误 Slope ± *SE*	LC_{50}（95%置信限）（mg/L） LC_{50}（95% confidence limit）	卡方值 Chi-square	抗性倍数（RR） Resistance ratio
SS	1.02±0.12	0.08（0.06－0.10）	1.15	1.00
TA-SD	1.84±0.31	4.35（3.15－5.84）	0.53	54.38
YC-SX	2.07±0.33	5.06（3.83－6.65）	0.97	63.25
HD-BJ	1.03±0.12	5.53（4.14－7.18）	0.81	69.13
TX-BJ	1.54±0.13	10.91（4.06－30.83）	36.19	136.38
CS-HN	1.94±0.21	12.86（10.82－15.59）	1.64	160.75
SY-HN	1.97±0.22	25.22（20.84－30.82）	0.55	315.25
WF-SD	1.36±0.20	38.48（21.41－135.73）	5.95	481.00
MY-BJ	1.82±0.22	122.14（98.57－152.86）	0.55	1 526.75

SS：敏感种群 Susceptible strain. 田间种群代码同表 1。Field population codes same as Table 1.

2.2　二斑叶螨对阿维菌素抗性水平与抗性基因突变频率的相关性

二斑叶螨敏感和田间种群 *GluCl* 基因的点突变频率测定结果显示，在所检测的 30 头相对敏感二斑叶螨种群中，仅有 1 头是杂合子基因型（RS），其余 29 头均为敏感纯合子基因型（SS）。而在测试二斑叶螨田间种群中，抗性纯合子（RR）、杂合子和敏感纯合子这三种基因型都普遍存在。其中，北京密云种群 *GluCl* 基因点突变频率最高（91.7%），其次是山东潍坊（66.7%）和海南三亚种群（63.3%），突变频率最低的是山西运城种群（13.3%）（图 1：A）；进一步分析发现，二斑叶螨供试种群对阿维菌素的抗性倍数与其 *GluCl* 的 G323D 点突变频率之间具有显著的线性相关性（$P=0.007$）（图 1：B）。

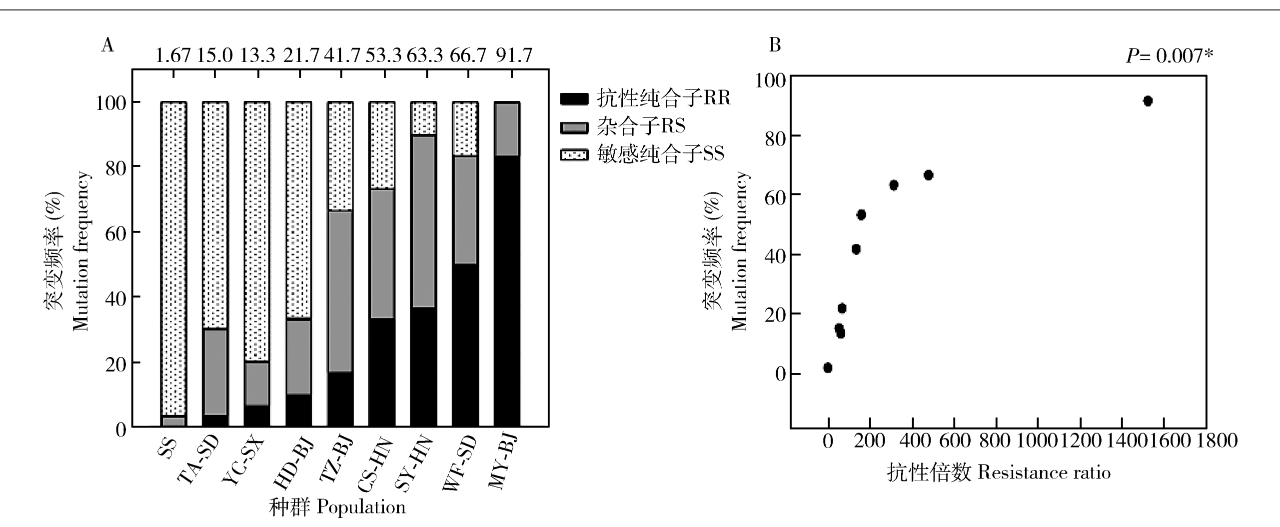


图 1　二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗性与 *GluCl* 基因突变频率的相关性分析

Fig. 1　Linear regression analysis between abamectin resistance and the mutation frequency of *GluCl* in field populations of *Tetranychus urticae*

A：*GluCl* 基因突变频率 Mutation frequency of *GluCl*；B：田间种群对阿维菌素的抗性与 *GluCl* 基因突变频率的相关性 Linear regression analysis between abamectin resistance of field populations and the mutation frequency of *GluCl*. RR：抗性纯合子 Resistant homozygote；RS：杂合子 Heterozygote；SS：敏感纯合子 Susceptible homozygote.

2.3　二斑叶螨 *GluCl* 和 *GABAR* 基因的表达量

二斑叶螨相对敏感和采自北京密云的抗性种群中 *GluCl*，*GABAR*1 和 *GABAR*2 的相对表达量见图 2。结果表明，抗性相关基因 *GluCl*，*GABAR*1 和 *GABAR*2 的相对表达量在二斑叶螨抗性种群中显著低于敏感种群；田间抗性种群中的 *GluCl*，*GABAR*1 和 *GABAR*2 的相对表达量分别是敏感种群的 40.28%，50.15% 和 53.15%，差异达显著水平（$P<0.05$）（图 2）。

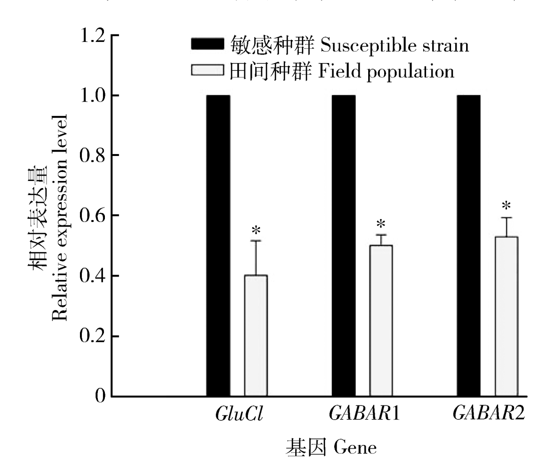


图 2　二斑叶螨敏感和北京密云抗性种群 *GluCl*，*GABAR*1 和 *GABAR*2 的相对表达量

Fig. 2　Relative expression levels of *GluCl*，*GABAR*1 and *GABAR2* in the susceptible and resistant populations of *Tetranychus urticae*

图中数值代表均值 ± 标准误，星号代表在二斑叶螨敏感和抗性种群间有显著差异（单因素方差分析 Duncan 氏多重比较，$P<0.05$）。Values are mean ± *SE*. Bars with asterisk indicate statistically significant difference (one-way ANOVA, Duncan's multiple-range test, $P<0.05$) for each gene between the susceptible and resistant populations.

3　讨论

阿维菌素广泛应用于田间包括二斑叶螨在内的有害生物防治中，相继有研究发现在山东、北京等二斑叶螨田间种群对阿维菌素产生了极高水平的抗性（刘庆娟，2012；唐小凤等，2014；Tang *et al.*，2014）。本研究采用药管浸叶法叶螨生物测定技术对我国二斑叶螨种群进行抗药性监测，发现所监测的从南至北的 8 个田间种群均对阿维菌素产生了高水平或极高水平抗性，抗性水平最高的为北京密云种群，达到 1 526.75 倍，结合 2014 年北京 4 个地区二斑叶螨种群对阿维菌素的抗性测定结果（唐小凤等，2014），表明二斑叶螨田间种群对阿维菌素还维持在高抗水平。值得注意的是，本研究中北京海淀二斑叶螨田间种群对阿维菌素的抗性倍数为 69.13 倍，而唐小凤等（2014）采用玻片浸渍法测定北京海淀种群的抗性倍数达 2 234.78 倍，为极高抗性水平，差异较大。虽然二者同为二斑叶螨海淀种群，但其种群的采集年份、采集寄主、采集的具体地点等存在差异，不同采集点的田间种群与其周围环境、种群最初来源及用药历史等有密切关系（王少丽等，2014），可能是造成这种抗性差异的重要因素。综合前述抗性监测和本文结果，表明我国二斑叶螨田间种群普遍存在对阿维菌素的高抗性状况，各地区在防控二斑叶螨时都应选择性慎用阿维菌素。

传统上评价叶螨对杀螨剂的抗药性发展程度通常采用生物测定进行判定。与传统生物测定相比，采用 PASA 检测技术可以大大缩短抗药性检测时间。本研究 PASA 检测结果发现，二斑叶螨室内相对敏感种群中，所检测的 30 头样品中存在 1 头杂合子基因型（RS）；而在所测试的 8 个二斑叶螨田间种群中，这 3 种基因型都普遍存在，其中，北京密云种群 *GluCl* 点突变频率最高（91.7%），与 2013 年采集自北京密云和昌平的检测结果相似（唐小凤等，2014）；此外，山东潍坊和海南三亚种群的抗性基因突变频率分别为 66.7% 和 63.3%，而突变频率最低的种群为山西运城（13.3%）。然而，采集于 2014 年的北京海淀二斑叶螨田间种群，其基因突变频率为 21.7%，远远低于唐小凤等（2014）的检测结果，这也与两种群对阿维菌素的抗性倍数差异性是一致的。进一步分析发现，二斑叶螨供试种群对阿维菌素的抗性倍数与其 *GluCl* 基因的 G323D 点突变频率之间存在显著的线性相关性（$P = 0.007$），一方面说明了 *GluCl* 基因在所测试的 8 个二斑叶螨田间种群抗阿维菌素中发挥了重要功能，另一个方面也说明了部分地区二斑叶螨虽然对阿维菌素处于高抗性水平，但抗性相关基因突变频率并不高，例如山东泰安和山西运城地区，这些地区暂停阿维菌素使用后能否可使更多的二斑叶螨个体回复敏感基因型有待于继续监测。

值得注意的是，包括叶螨在内的害虫田间种群对杀虫剂抗药性机制比较复杂，解毒酶活力升高的生化机制通常与靶标变异抗性机制同时并存（Van Leeuwen *et al*., 2010）。近期研究发现，二斑叶螨抗性种群中存在 P450 家族基因过表达也导致了其对阿维菌素的高抗性产生（Riga *et al*., 2014），说明二斑叶螨对阿维菌素抗性种群除了出现靶标受体的点突变，还可能同时存在解毒酶活性升高的现象。因此，在研究分析二斑叶螨田间种群抗性形成及发展时，需考虑可能存在的导致抗药性产生的各种因素，如采集地区、寄主植物、用药历史等外在因子以及生化活性及基因变异等内在机制也会增强或减弱田间种群的抗性表现。

分析比较二斑叶螨抗性和敏感种群 *GluCl* 基因全长序列，发现除了存在 Kwon 等（2010）报道的该基因第 3 跨膜区的点突变（G323D）外，并未发现存在其他稳定的点突变（未发表数据）位点；而北京密云种群存在对阿维菌素的极高抗性水平，推测还可能存在其他的抗性机制。本研究采用荧光定量 PCR 技术检测了二斑叶螨相对敏感种群和田间抗性种群中与阿维菌素抗性可能相关的抗性基因（*GluCl* 与 *GABA*）的相对表达量，结果发现，田间抗性种群中的上述受体基因相对表达量均显著低于相对敏感种群，这与之前报道相似，例如卢文才（2009）和陈秋双（2013）相继报道朱砂叶螨对阿维菌素抗性种群中 *GABAR* 基因的 mRNA 相对表达量显著低于敏感种群。但在 Kwon 等（2010）的报道中，二斑叶螨对阿维菌素的抗性与 *GluCl* 基因的 mRNA 表达量有关，而未发现与 *GABAR* 基因 mRNA 的表达量有关，而本研究结果发现 *GABAR* 基因的表达量也显著下降，但这些基因表达量的下降是否与二斑叶螨对阿维菌素的抗药性直接相关，需要进一步采用 RNA 干扰结合生物活性测定来进行深入验证。另外，本研究中采用的二斑叶螨抗性种群为田间种群，而非由敏感种群汰选而来，因此只能间接反映田间种群抗性的高低与这些抗性基因的相对表达量水平之间存在着一定的联系，而田间种群用药历史相对复杂，抗性种群也可能存在着多种不同的抗性发展机制，因此有必要进一步研究田间抗性种群的生化和分子抗性机制。

参考文献（References）

Chen QS, 2013. Cloning and Expression of Genes Correlated with Target Resistance against Avermectin in *Tetranychus cinnabarinus*. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [陈秋双, 2013. 朱砂叶螨中阿维菌素作用靶标相关基因克隆与表达研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Clark JM, Scott JG, Campos F, Bloomquist JR, 1995. Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. *Annu. Rev. Entomol*., 40: 1–30.

Gorman K, Hewitt F, Denholm I, Devine GJ, 2001. New developments in insecticide resistance in the glasshouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) and the two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) in the UK. *Pest Manag. Sci*., 58(2): 123–130.

Kwon DH, Yoon KS, Clark JM, Lee SH, 2010. A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Mol. Biol*., 19(4): 583–591.

Li MY, 2012. Disease monitoring by Mingyuan Li (twenty seven) uncontrolled *Tetranychus urticae*. *Agricultural Engineering Technology (Horticulture in Greenhouse)*, (9): 66–67. [李明远, 2012. 李明远断病手迹(二十七)难防的二斑叶螨. 农业工程技术(温室园艺), (9): 66–67]

Liu FY, Li HL, Qiu JY, Zhang YX, Huang LC, Li H, Wang GZ, Shen JL, 2010. Monitoring of resistance to several insecticides in brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in Huizhou. *Chinese Bulletin of*

Entomology, 47(5): 991 – 993.［刘凤沂，李惠陵，邱建友，张燕雄，黄丽聪，李华，王国忠，沈晋良，2010. 惠州地区褐飞虱对几种药剂的抗药性监测. 昆虫知识，47(5): 991 – 993］

Liu QJ, Liu YJ, Yu Y, Zhou XH, Ma H, 2012. The study on resistance and its mechanism of *Tetranychus urticae* to several common insecticides. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 376 – 381.［刘庆娟，刘永杰，于毅，周仙红，马惠，2012. 二斑叶螨对七种杀螨剂的抗药性测定及其机理研究. 应用昆虫学报，49(2): 376 – 381］

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Lu WC, 2009. Effects of Abamectin and Heat Stresses on the Expression of GABA and GABA Receptor in *Tetranychus cinnabarinus*. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing.［卢文才，2009. 阿维菌素和高温胁迫对朱砂叶螨 γ-氨基丁酸及其受体表达的影响. 重庆：西南大学硕士学位论文］

Nauen R, Stumpf N, Elbert A, Zebitz CPW, Kraus W, 2001. Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag. Sci.*, 57(3): 253 – 261.

Riga M, Tsakireli D, Llias A, Morou E, Myridakis A, Stephanou EG, Nauen R, Dermauw W, Van Leeuwen T, Paine M, Vontas J, 2014. Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 46: 43 – 53.

Rugg D, Buckingham SD, Sattelle DB, Jansson RK, 2005. The insecticidal macrocyclic lactones. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 5. Elsevier, Oxford. 25 – 52.

Tang XF, Wang SL, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, 2014. Abamectin resistance of *Tetranychus urticae* and detection for resistance-related gene by PASA technique. *Acta Phytophylacica Sinica*, 41(1): 67 – 73.［唐小凤，王少丽，张友军，吴青君，谢文，2014. 二斑叶螨对阿维菌素的抗药性及抗性基因的 PASA 检测技术. 植物保护学报，41(1): 67 – 73］

Tang XF, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Wang SL, 2014. Stage-specific expression of resistance to different acaricides in four field populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.*, 107(5): 1900 – 1907.

Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L, 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(8): 563 – 572.

Wang L, Zhang YJ, Xie W, Wu QJ, Wang SL, 2015. A bioassay for evaluation of the resistance of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) to selected acaricides. *Syst. Appl. Acarol.*, 20(6): 579 – 590.

Wang SL, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Xu BY, 2014. Dominant species identification of spider mites on vegetables in some areas in Beijing and Hebei. *Journal of Environmental Entomology*, 36(4): 481 – 486.［王少丽，张友军，吴青君，谢文，徐宝云，2014. 京冀地区蔬菜叶螨优势种类鉴定. 环境昆虫学报，36(4): 481 – 486］

Yang SY, Yue XL, Wang JJ, Shen HM, 2013. Screening of suitable reference genes and expression profiling of CYP392E subfamily genes in different resistant strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(10): 1152 – 1159.［杨顺义，岳秀利，王进军，沈慧敏，2013. 二斑叶螨不同抗性品系最佳内参基因的筛选及 CYP392E 亚家族基因的表达分析. 昆虫学报，56(10): 1152 – 1159］

（责任编辑：袁德成）